

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 08 June 1999 (08.06.99)	
International application No. PCT/JP98/04772	Applicant's or agent's file reference H1-806PCT
International filing date (day/month/year) 21 October 1998 (21.10.98)	Priority date (day/month/year) 22 October 1997 (22.10.97)
Applicant OTA, Toshio et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

17 May 1999 (17.05.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Sean Taylor
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

完全長cDNAライブラリーに向けて キャップ構造のオリゴヌクレオチドによる置換

菅野純夫・丸山和夫

蛋白質のもつ機能を理解するために、その一次構造を決定し、そのcDNA クローンを得ることが重要な一歩となる。cDNA プロジェクトはこの過程の効率化を目指している。したがって、cDNA プロジェクトにとって、完全長cDNA ライブラリーの作製はきわめて重要である。完全長cDNA ライブラリー作製にあたって、まず、cDNA クローンが完全長か否かを判断できることが必要で、筆者らはその一つの方法として、mRNA のキャップ構造をオリゴヌクレオチドで置換することを考えた。もし、これが可能であれば、この配列をもつcDNA クローンは完

全長であると考えられるし、また、特異な配列をもつオリゴヌクレオチドを mRNA の 5' 末端に結合させることで、他のさまざまな応用も考えられる。筆者らは、ホスファターゼ、ピロホスファターゼ、RNA リガーゼを用いてオリゴヌクレオチドを mRNA の 5' 末端に結合させることができた。さらに、このことを踏まえ、完全長cDNA ライブラリーの作製のためのベクターの設計と開発を行なった。これらは、完全長cDNA ライブラリー作製への一歩と考えられる。

はじめに

分子のレベルで生命を考えると、蛋白質が中心的な機能分子であることは疑いがない。細胞あるいは生体内には、多種類の蛋白質が存在し、蛋白質どうし、または他の分子との相互作用により、細胞や生体内のさまざまな機能を実現している。したがって、蛋白質をコードしているcDNA を分離し、コードする蛋白質の機能を知ることは、生命を分子レベルで理解するために不可欠であるといえよう。また、これらのcDNA を利用し、さまざまな実用的価値をもつものをつくりだしていくことも重要である。

ヒトは約10万種類の遺伝子を持ち、ある特定の細胞では2~3万種類の蛋白質が発現していると推定されて

いる。これまでにクローン化されたのは、その中の1割弱と考えられている。現在のところ、1年あたり1~2千クローンのペースでcDNA のクローン化が進んでいる。この調子で進むと、40~50年でヒトのすべての蛋白質のcDNA をクローン化でき、その一次構造も明らかにされる計算になる。cDNA プロジェクトはこの過程の効率化をめざし、均一化cDNA ライブラリー、完全長cDNA ライブラリー、subtracted cDNA ライブラリーの作製法の開発、cDNA ライブラリーの迅速なカタログ化の方法の開発、一次構造の決定に必要な体制の整備などを行なっている。筆者らは、この中で、完全長cDNA ライブラリーの作製を目指し、そのための技術開発を行なってきた。まだまだ、途中であるが、筆者らの工夫を以下に紹介したい。

Sumio Sugano, Kazuo Maruyama, 東京大学医科学研究所(〒108 東京都港区白金台4-6-1) [Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan]

Toward the Construction of a Full Length cDNA Library

Key word [TAP] [RNA リガーゼ] [アダプター]

I 完全長 cDNA とは

最終的に一次構造の決定を目指し、cDNA を網羅的にクローン化しようとする cDNA プロジェクトにおいて、完全長 cDNA ライブラリーの重要さは言を待たない。cDNA ライブラリー中のクローンの多くが完全長の場合、塩基配列の決定や、発現による機能の解析を効率よく進めることができる。このように、完全長 cDNA を作製することは cDNA 合成技術の開発において重要な目標といえる。また、この技術は個々の cDNA クローニングにおいても意味をもち、cDNA プロジェクト以外の分野への波及効果が期待できる。

普通、完全長 cDNA の作製の問題は、長い cDNA を作製する問題として捉えられる傾向がある。個々の cDNA クローニングでは、そのとおりであり、したがって、鋳型となる mRNA の質や逆転写酵素の効率が問題にされる。しかしながら、長い cDNA がすなわち完全長 cDNA ではないことに注意しなければならない。完全長 cDNA の定義は“mRNA のキャップ構造近傍から poly(A) 間の塩基配列に相補的な DNA”というのが妥当であろう。実際、300 塩基長の完全長 cDNA もあれば、10 000 塩基長の不完全長 cDNA もあるのである。このことは、cDNA プロジェクトのように未知の cDNA

クローンを大量に扱う場合、大きな問題となってくる。すなわち、長い cDNA をつくることとは別に、完全長と不完全長の cDNA クローンを簡単に区別する必要がある生じるのである。

筆者らは、完全長と不完全長の cDNA を区別する工夫の一つとして、mRNA のキャップ構造をオリゴヌクレオチドで置換することを考えた。もし、置換が可能であれば、そのオリゴヌクレオチドをもつ cDNA クローンはキャップ構造近傍の塩基配列をもつことになり、完全長の cDNA の候補となる。また、cDNA ライブラリーを作製する場合、第二鎖目の合成時にオリゴヌクレオチドに相補的なプライマーを用いることで、リボヌクレアーゼ H を用いることなくアルカリによって RNA を除去しヌクレアーゼ活性のない DNA ポリメラーゼを使用し第二鎖の合成ができる。この場合、ライブラリーには完全長 cDNA クローンが濃縮されていると考えられる。さらに、個々の cDNA の場合は、置換した配列と既知のものを利用して PCR による 5' 末端 cDNA の増幅、クローン化ができるのである。

II キャップ構造のオリゴヌクレオチドでの置換

1 原理

キャップ構造をもつ mRNA をタバコ-アルカリ-ピロホスファターゼ (TAP) で処理すると、キャップと第一番目の塩基 (mRNA 転写開始塩基) との間が切断され mRNA の 5' 末端がリン酸基となる (図 1)。そこで、ホスファターゼによって、キャップ構造をもたない RNA の 5' 末端に存在するリン酸基を除いたのち、TAP 処理を行なうと、キャップ構造をもった RNA の 5' 末端のみに、リン酸基を残すことができる。T4 RNA リガーゼは、3' 末端に水酸基をもつオリゴヌクレオチド (アクセプター) に 5' 末端にリン酸基をもつオリゴヌクレオチド (ドナー) を結合する活性をもつ (図 2)。したがって、上記のように、ホスファターゼ処理後 TAP 処理した mRNA に、T4 RNA リガーゼにて適当なオリゴヌクレオチドを結合させると、キャップの結合していた転写開始塩基のみに、適当なオリゴヌクレオチドを結合させることが

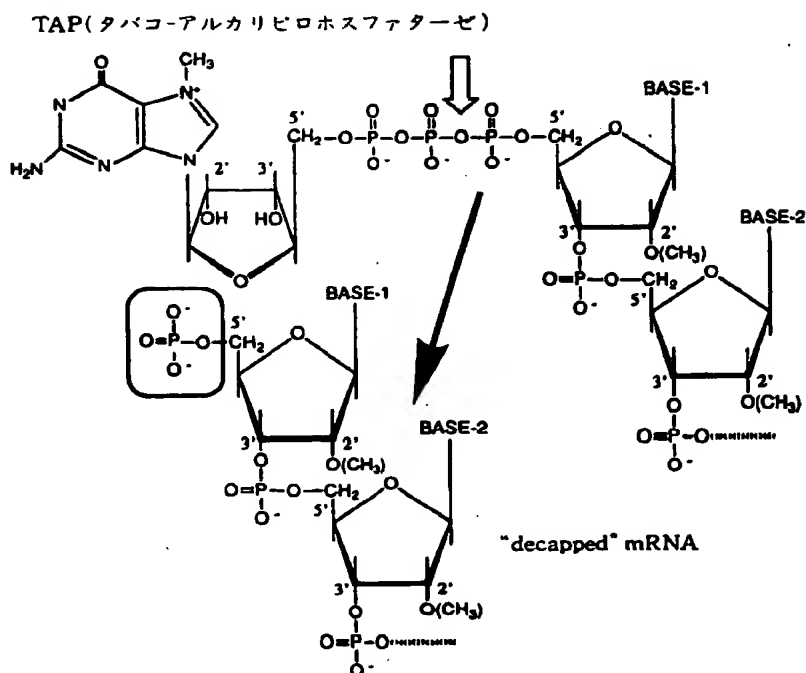


図 1 TAP によるキャップの除去

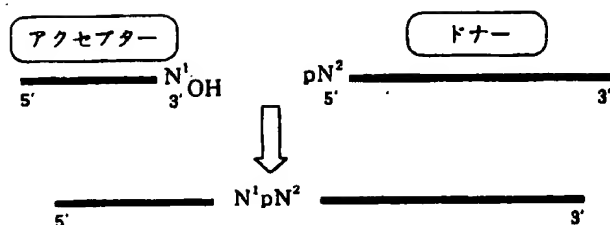
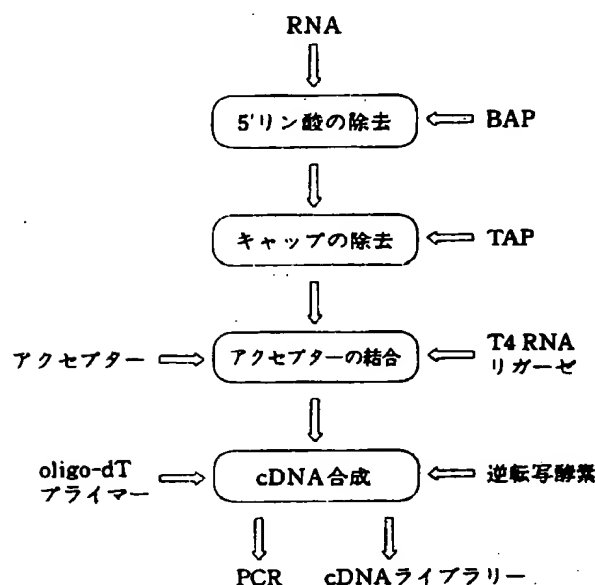


図2 RNAリガーゼによるオリゴヌクレオチドの結合

図3 オリゴヌクレオチドを用いたキャップの置換手順
詳細は本文参照。キャップを置換後のcDNA合成はランダムプライマーを用いてもよい。

できる。アクセプターとしてのオリゴヌクレオチドはさまざまに設計することが可能である(図3)。

2 材料

酵素類:すべて、市販のものが利用可能であるが、TAPは当初供給が不安定だったため、みずから培養タバコ細胞(BY-2)から精製を行なった^{1,2)}。精製したTAPは市販のものに比べて活性が約千倍高く、使用濃度においてRNA分解酵素活性は検出できなかった。数10gのタバコ細胞から今後の実験に十分な量を確保した。

モデルRNA:mRNA(ドナー)のモデルとしては、アデノウイルスE1A遺伝子のpoly(A)シグナルを含む末端に30個のアデニン加えた約250塩基の*in vitro*転写産物とキャップをもつ市販のウサギβ-グロビンmRNA(約600塩基)を使用した。アクセプターは、SP6ポリメラーゼで*in vitro*合成したRNAや合成オリゴ

ヌクレオチドを使用した。

3 反応条件など

ホスファターゼ、TAPは標準的な条件で反応を行なう。T4 RNA リガーゼの結合活性は比較的低いことが知られていた。しかし最近、PEGなどを反応液に加えることで短い分子ではかなり効率よく結合反応が起こることが報告された(例えば文献3)。反応液組成・反応温度・反応時間などを検討した結果、PEG存在下でモデルRNA(250塩基)を3~5割の効率で結合させることが可能であった。長いRNA分子間で高率な結合がみられることは、アクセプターにさまざまな活性部位を導入できることを示している。

4 β-グロビン mRNA 5' 末端の増幅

図3に従い、β-グロビン mRNA をバクテリアアルカリホスファターゼとTAPで処理し、その後、合成オリゴヌクレオチドとT4 RNA リガーゼで結合させた。oligo-dTをプライマーにcDNAを合成したのち、cDNAを鋳型に、図4に示すプライマーを用いてPCRを行なった。この結果、図4にみられるように、合成オリゴヌクレオチドが5'末端に結合した場合に期待される長さのPCR産物が得られた。すなわち、キャップ構造をオリゴヌクレオチドで置換しえたものと考えられる。

5 アクセプター・ドナーの区別

合成オリゴヌクレオチドは3'末端にOH基をもち、5'末端にリン酸基をもたないためアクセプターになるがドナーにはならない。一方、mRNAの方は、TAP処理により1個のリン酸基が5'末端に残るためドナーになる。それと同時に、3'末端にOH基があるためアクセプターにもなりうる。アクセプターとドナー分子を完全に区別するためには、ドナー分子の3'末端のOH基の部分をブロックする必要がある。はじめ、poly(A)ポリメラーゼでmRNAの3'末端にコルディセピン5'三リン酸(ATPの3'OHをHに換えた構造をもつ)の導入を考えた。しかし、poly(A)ポリメラーゼの非常に高い基質特異性のためコルディセピンは導入できなかった。次に、T4 RNA リガーゼの最小基質であるpCp(図5)の導入を検討した。pCpは現在アイソトープでしか入手できず至適濃度での検討はできなかったが、効率よく3'末端がブロックできることがわかった。pCpを

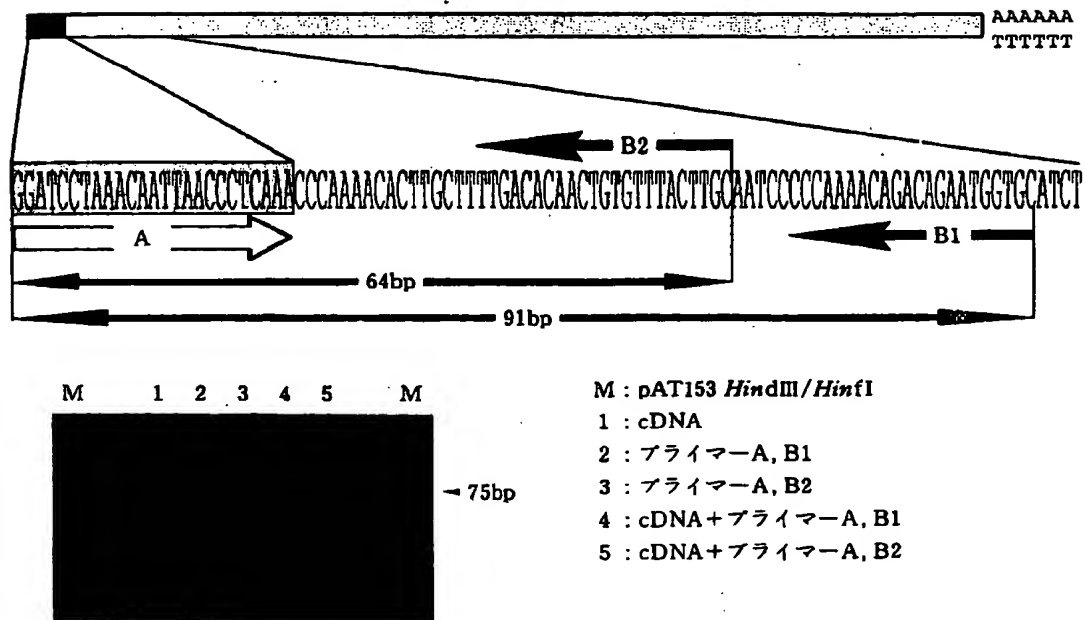
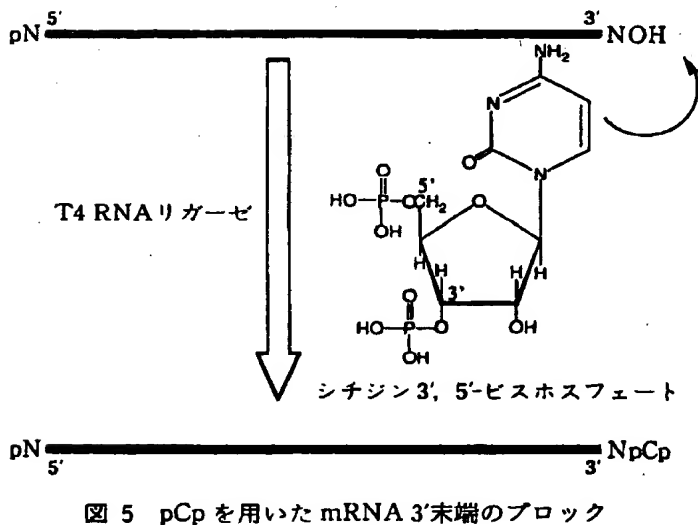


図4 キャップを置換した mRNA を用いての 5'末端の同定
 β -グロビン mRNA のキャップを図3に示した方法で A のオリゴヌクレオチドで置換し、その後 cDNA として、それを A と B1 または A と B2 をプライマーにして PCR を行なった。それぞれ、A が mRNA の 5'末端に結合した場合に期待される長さの PCR 産物ができていることがわかる。A と B1 を使用した場合には、A と B1 が直接結合したと考えられる位置に、cDNA の有無にかかわらず PCR 産物がみえる。



用いたブロックはホスファターゼ処理後 TAP 処理前に行なう必要がある。

III ベクターの改良

1 ベクター・アクセプター・プライマーの設計

完全長 cDNA を特異的にクローニングするためのベクター・アクセプター・プライマーの作製を行なった。

満たすべき条件は、(1) アクセプター配列をもつ(つまり、5'末端まで伸びた)cDNA のみをクローン化する、(2) mRNA の 5'末端 3'末端の方向を決めてクローン化できる、(3) cDNA のないクローンは生じない、である。(1)については、出現頻度の低い制限酵素切断部位をアクセプターに導入し、その切断部位が存在することをアクセプター配列をもつことを目安とした。このために選んだ制限酵素は *Sfi*I である。*Sfi*I は 8 塩基認識の制限酵素で、3 塩基長の 3'突出端の切り口をもつ。この切り口にあたる 3 塩基は切断部位の認識配列に含まれないので、自由に配列を選べる。*Dra*III は 6 塩基認識の制限酵素であるが、*Sfi*I と同様の切り口をもつ。5' と 3' のクローニング部位を互いに相補的でない塩基配列をもつ *Dra*III 部位とし、5' 側の *Dra*III 部位はアクセプターの *Sfi*I 部位に対応し、3' 側の *Dra*III 部位は cDNA 合成の oligo-dT プライマーの *Sfi*I 部位に対応するように設計すると、(2)と(3)の条件を満たす(図6)。すなわち、ベクターを *Dra*III で切断し、不必要な断片を除去するとベクター自体の再環状化が起こらない。また、図7のような oligo-dT プライマー + *Sfi*I をプライマーにしてキャップをアダプターで置換した mRNA の cDNA を定法ど

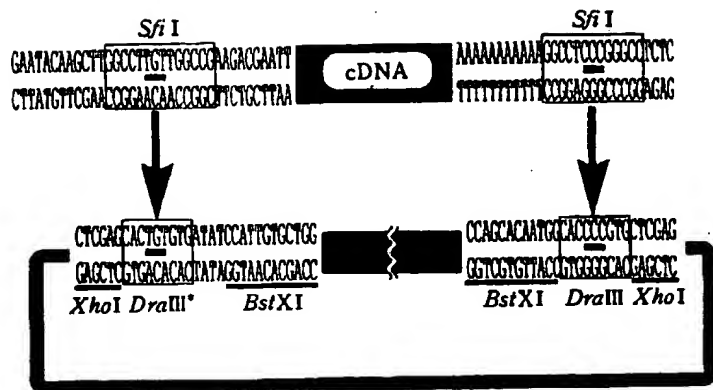


図6 *Sfi*Iを利用したクローニングシステム

詳細は本文参照。この例では、キャップを置換するオリゴヌクレオチドの*Sfi*I部位の断端はTGT、cDNA合成のオリゴdTアダプター上の*Sfi*I部位の断端はGGGとなるようにしてあり、cDNA どうしもベクターどうしも結合できない。

おり合成したのち、*Sfi*Iによる切断をすれば、生じたcDNA断片を方向を決めてベクターの*Dra* III部位に挿入できる。

この方法のよいところは、ベクターどうしだけでなくcDNA どうしも互いに結合できない点にある。現在使用されているcDNAライブラリーには、cDNA どうしがライブラリーの作製過程で結合した結果、2種以上のcDNAをもつようになったクローンが一定の割合で存在するため、cDNAプロジェクトでの問題の一つになっている。この方法の欠点は*Sfi*IでcDNAを切断する必要がある点で、このため、8塩基認識で頻度は低いとはいえ、*Sfi*I認識部位をもつcDNAはクローン化されない。

2 ベクターの作製

動物細胞での効率のよい発現を目指すpME 18 SCG, cDNAの一次構造決定に有用なベクターpMFL—を作製した。ともに、上記の*Dra* IIIクローニング部位をもち、pME 18 SCGは強力なプロモーターのSR α を、pMFL—は*Exo* IIIを利用した欠失の作製に有用な部位と一本鎖DNA作製のために必要な*f1 ori*をもっている(図7)。

おわりに

完全長cDNAライブラリーの作製をめざして筆者らが開発した、mRNAのキャップ構造をオリゴヌクレオチドにより置換する方法について紹介してきた。 β -グロビンmRNAを用いた予備検討の結果、アクセプター分子をキャップのかわりに結合させることが可能であった。長いアクセプター分子も効率よく結合できることから、さまざまな活性をもつ塩基配列を結合することが可能で設計の自由度は非常に高い。さらに、各種酵素と基質の使い分けによってアクセプターとドナー分子を完全に区別できることから、少量の試料からライブラリーの作製が可能と思われる。また、効率のよい完全長cDNAのクローニング系をめざして、いくつかのベクターを作製した。将来的には、数種の組織から完全長cDNAライブラリーを作製し、必要に応じて希望者に供給できるようにしていきたいと思う。

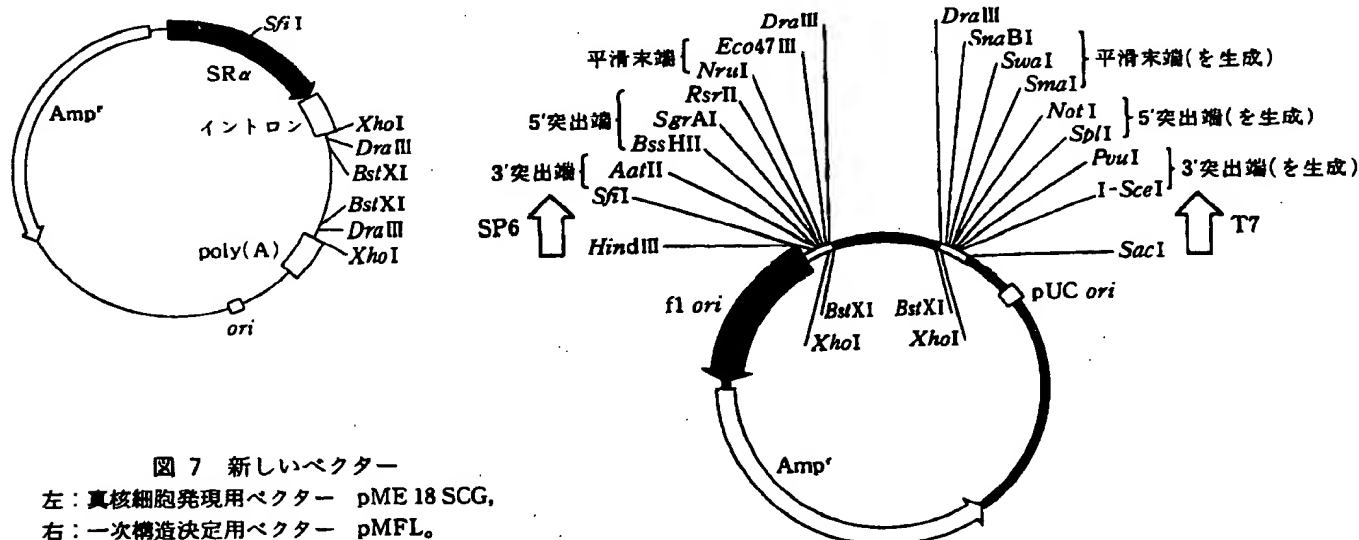


図7 新しいベクター

左：真核細胞発現用ベクター pME 18 SCG,
右：一次構造決定用ベクター pMFL。

均一化 cDNA ライブラリー, 完全長 cDNA ライブラリー, subtracted cDNA ライブラリーの作製法の開発や cDNA ライブラリーのカatalog化など, cDNA プロジェクトが初期に目指した目標は徐々に達成されつつある。今後は, これらのライブラリーから分離された cDNA の塩基配列の決定や機能の解析が前面へとでてくるだろう。したがって, その方向での技術開発が重要となる。現在, 塩基配列の決定の効率は 1 クローン 1 操作あたり 300 塩基前後である。もしこれが 1000 塩基前後となれば, cDNA の塩基配列決定の効率は飛躍的に向上し, 2000 塩基前後となれば, 多くの mRNA の長さから考えて, それ以上の向上は必要ないレベルとなる。この程度の向上は, 既存の技術の延長上に達成されるのではないと思われる。10 年後, われわれは, ほとんどの遺伝子の cDNA 塩基配列が決定されて

いる世界で研究しているかもしれない。

mRNA のキャップのオリゴヌクレオチドによる置換について貴重なご教示をいただいた, 北里大学の水本清久教授, BY-2 細胞を分与していただいた日本たばこ株式会社生命科学研究所の増田 税主任研究員に感謝いたします。

文 献

- 1) Shinshi, H., Miwa, M., Kato, K., Noguchi, M., Matsu-shima, T., Sugimura, T.: *Biochemistry*, 15, 2185-2190 (1976)
- 2) Efstratiadis, A., Vournakis, J.N., Donis-Keller, H., Chaconas, G., Dougall, D.K., Kafatos, F.C.: *Nucl. Acids Res.*, 4, 4165-4174 (1977)
- 3) Tessier, D.C., Brousseau, R., Vernet, T.: *Anal. Biochem.*, 158, 171-178 (1986)

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 08 OCT 1999

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 H1-806PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/04772	国際出願日 (日.月.年) 21.10.98	優先日 (日.月.年) 22.10.97
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ⁶ C12N15/10		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ヘリックス研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 17.05.99	国際予備審査報告を作成した日 24.09.99	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 滝本 晶子	4 B 9452
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性（N）

請求の範囲 1 - 7 有
請求の範囲 無

進歩性（I S）

請求の範囲 1 - 7 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性（I A）

請求の範囲 1 - 7 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明（PCT規則70.7）

請求の範囲1 - 7に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献に記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。

13T
Translation
5000
09/529962

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H1-806PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP98/04772	International filing date (day/month/year) 21 October 1998 (21.10.98)	Priority date (day/month/year) 22 October 1997 (22.10.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/10		
Applicant HELIX RESEARCH INSTITUTE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 17 May 1999 (17.05.99)	Date of completion of this report 24 September 1999 (24.09.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/04772

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 98/04772

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement			
Novelty (N)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-7	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The invention described in Claims 1-7 is not described in the documents cited in the international search report, nor is it obvious to a person skilled in the art.

PCT



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 H1-806PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/04772	国際出願日 (日.月.年) 21.10.98	優先日 (日.月.年) 22.10.97
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヘリックス研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ C12N15/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ C12N15/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG)、WPI/L (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 94/08001, A1 (財団法人神奈川科学技術アカデミー), 14. 4月. 1994 (14. 04. 94) & JP, 6-153953, A&EP, 625572, A1	1-7
A	WO, 96/34981, A2 (GENSET), 7. 11月. 1996 (07. 11. 96) & EP, 824598, A2&FR, 2733762, A1&FR, 2733765, A1	1-7
A	Maruyama, K., et al. "Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides", Gene, Vol. 138(1994), p. 171-174	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 01. 99

国際調査報告の発送日

26.01.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高



4B

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Kato, S., et al. "Construction of a human full-length cDNA bank", Gene, Vol. 150 (1994), p. 243-250	1 - 7
A	Carninckle, P., et al. "High-Efficiency Full-Length cDNA Cloning by Biotinylated CAP Trapper", Genomics, Vol. 37 (1996), p. 327-336	1 - 7
A	Edery, I., et al. "An Efficient Strategy To Isolate Full-Length cDNAs Based on an mRNA Cap Retention Procedure (CAPture)", Molecular and Cellular Biology, Vol. 15 (1995), p. 3363-3371	1 - 7
A	Solovyev, V., et al. "Predicting internal exons by oligo-nucleotide composition and discriminant analysis of spliceable open reading frames", Nucleic Acids Research, Vol. 22 (1994), No. 24, p. 5156-5163	1 - 7
A	Heindell, H. C., et al. "The Primary Sequence of Rabbit α -Globin mRNA", Cell, Vol. 15 (1978), p. 43-54	1 - 7
A	鈴木穰 等「RT-PCR法 オリゴキャップ法によるmRNA 5'末端のクローニング」蛋白質核酸酵素, Vol. 41, No. 5 (1996), p. 603-607	1 - 7
A	菅野純夫 等「完全長cDNAライブラリーに向けて キャップ構造のオリゴヌクレオチドによる置換」蛋白質核酸酵素, Vol. 38, No. 3 (1993), p. 476-481	1 - 7
A	Carninci, P., et al. "High Efficiency Selection of Full-length cDNA by Improved Biotinylated Cap Trapper", DNA Research, Vol. 4, No. 1 (1997), p. 61-66	1 - 7

RT-PCR法

② オリゴキャップ法によるmRNA 5'末端のクローニング

鈴木 稔・菅野純夫

mRNAの5'末端を分離する方法としてオリゴキャップ法を紹介する。オリゴキャップ法はmRNAのキャップをTAPでずらし、そこに合成オリゴヌクレオチドをRNAライゲースで結合させて、5'をマークし、合成オリゴヌクレオチドに対応する配列と分離したいmRNAの配列を利用したPCRで5'末端を増幅する方法である。この方法はRNAを直接取り扱うので手技的にむずかしいものの、原理的には本当のmRNAの5'末端を分離できる方法である。

key words 【オリゴキャップ法】

はじめに mRNAの5'末端をクローニングする方法には、RACE法など、いくつかの方法がある。このなかで、筆者らの開発したオリゴキャップ法は、いままでにない原理を応用した方法である。RACE法など従来の方法は、基本的に、存在するcDNAのなかで1番長いものを分離しようとする方法といえる。逆転写酵素はmRNAの5'末端を超えてcDNAを伸ばすことはできないと考えられるので（実際にはヘアピン構造をつくって長く伸びてしまう場合もあるが）、一番長いcDNA=5'末端まで伸びたcDNAと考えるわけである。この原理は基本的にたいへん結構なのだが、実際においては、cDNAをつくりつくし、調べつくすことが不可能なので、得られたクローンが本当に5'末端まで伸びたものなのか、常に一抹の不安を残すことになる。とくにスタートコドンと思われるものの前にインフレームのストップコドンがない場合など、強い不安にかられることが多い。

これに対し、オリゴキャップ法はmRNAの5'末端に存在するキャップ構造を標的にした方法で、合成オリゴヌクレオチドでキャップ構造を置換することがその基本になっている。cDNAが5'末端のものかどうかの判断は、cDNAの長さではなく、オリゴキャップに用いたオリゴの塩基配列が、cDNAの末端に存在するかどうかによって行なう。そしてこの場合、オリゴの結合している塩基がmRNAの転写開始のまさにその塩基ということになる。この方法でmRNAの5'末端をもつクローンを分離すると、従来のものよりたいてい長いものがとれてくるが、ときには短い場合もある。この場合、複数の転写開始部位があると考えたほうがよい場合が多い。

オリゴキャップ法はRNAを操作するために手技的にむずかしく、また、必要な酵素も、よい質のものが手に入りにくいこともあって、広く行なわれる方法になっていない。しかし、上記のように、従来の方法とは

Yutaka Suzuki, 東京大学大学院総合文化研究科 (〒113 東京都文京区本郷 7-3-1) [International and Interdisciplinary Studies, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan]

Sumio Sugano, 東京大学医科学研究所 (〒108 東京都港区白金台 4-6-1) [Institute of Medical Science, University of Tokyo, Sirogandai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan]

Isolation of mRNA 5'-end Using Oligo-Capping

異なるものであり、それなりのメリットのあるものなので、キット化などの努力をして、多くの方に使っていただけるシステムにしていきたいと考えている。

I. オリゴキャップ法の原理

図1にオリゴキャップ法の概要を、また図2にはそれによる mRNA 5' 末端クロニングの全体像を示した。オリゴキャップ法はもともと、mRNA のスタートの塩基を決定する際に用いられたポストラベル法を基礎にしている。すなわち、酸性ピロフォスファターゼ (TAP) でキャップをはずす (図3参照)。その後、露出した 5' 末端のリン酸基を標的に、合成オリゴヌクレオチドを RNA ライゲースで 5' 末端に結合させるわけである。ただ、細胞から分離してきた mRNA [ポリ(A)+RNA] には、途中で切れた RNA やミトコンドリアの由来の mRNA など、キャップをもたないものも多数ある。したがって、結合をキャップ特異的に行なわせるために、キャップをもたないものの 5' 末端に存在するリン酸基をフォスファターゼ (BAP) であらかじめはずしておく。

RNA ライゲースは 1 本鎖の RNA または DNA を結合させることができる。ただ、RNA-RNA の場合に比べ、DNA-RNA の場合の効率は 1/10、DNA-DNA の場合は 1/100 といわれている。実際、オリゴキャップのオリゴとして DNA を使用してみたが、うまくいかなかったことが多かった。いまは、RNA と DNA のキメラ分子を作製することができる。DNA オリゴの 3' 末端に 1~3 塩基の RNA を結合させることで RNA オリゴと同等の効率で RNA と結合させることができる (加藤ら: 私信)。

II. オリゴキャップ法を行なうにあたって考えること

1. RNA

RACE 法などは cDNA になったものを操作する。これに対し、オリゴキャップ法は RNA を扱う必要がある。

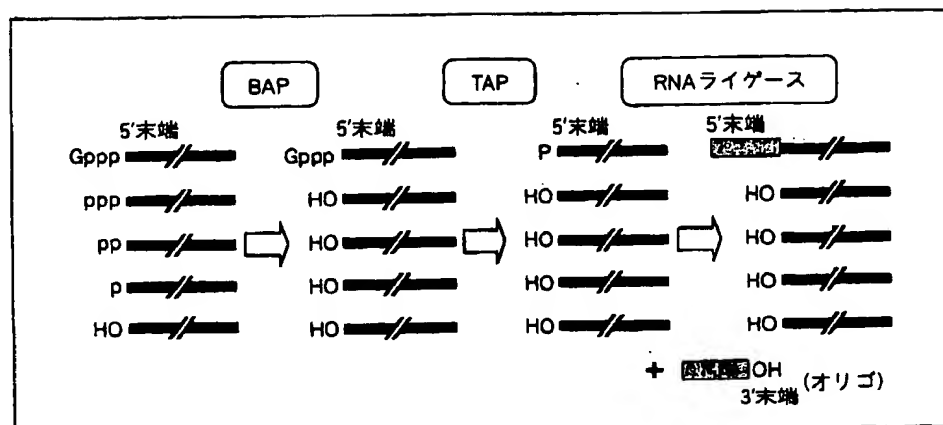


図1 オリゴキャップ法の概要

■: RNA, BAP: 細菌アルカリフォスファターゼ, TAP: タバコ酸性ピロフォスファターゼ。

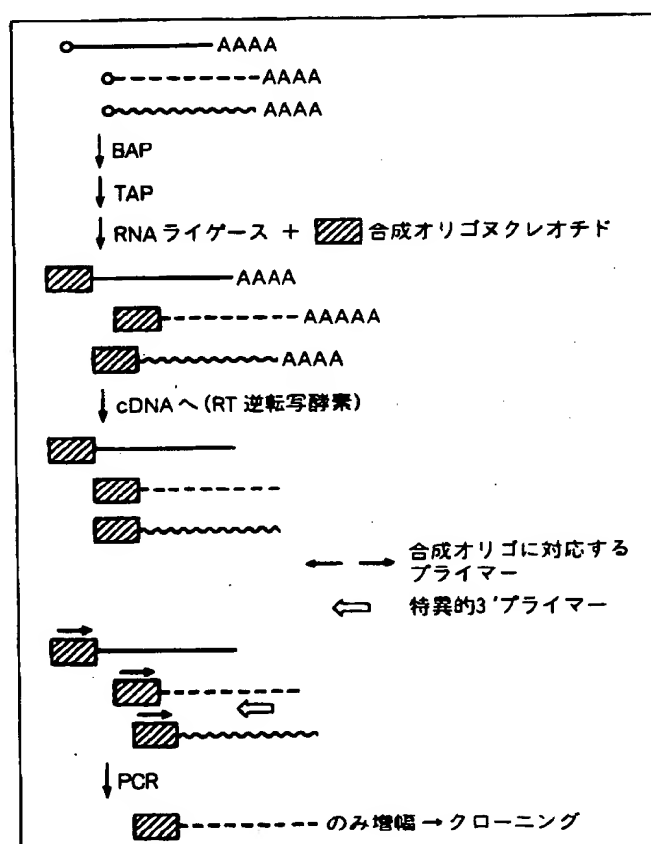


図2 オリゴキャップ法による 5' 末端クロニングの全体の流れ

したがって、RNA を扱った経験があったほうがよい。とくに、cDNA ライブラリーを作製した経験があることが望ましい。また、RNA を扱う体制が研究室にある必要がある。隣の人が大量に RNase を使用しているよ

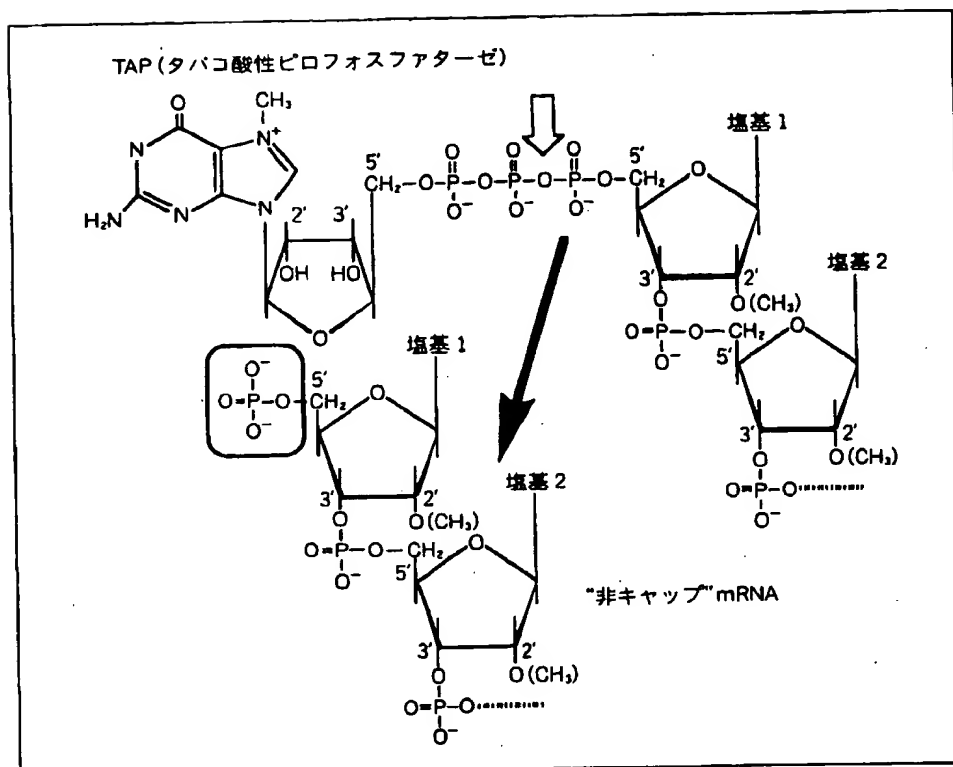


図 3 mRNA キャップ構造の TAP による切断

うな状態ではやらないほうが無難である。

また、RNA をかなりの段階を踏んで酵素処理していくので RNA が量的に確保されているほうがよい。培養細胞由来の RNA で目的があえばよいが、特殊な組織や細胞のものとなると量の確保が格段に困難になる。

2. 酵 素

酵素はもちろん、RNase のない酵素を使用する必要がある。具体的なプロトコールのところに、筆者らが使用している酵素をあげておいた。他のものは試していないものもあるので、個別にチェックする必要がある。とくに、TAP はよいものがなかったので、自分たちで精製した。筆者らが精製したものは、普通使用する濃度の 10 倍量、全 RNA と 37°C、2 時間反応させても 28S、18S リボソーム RNA はほとんど変化しないものである。もっとも、20 時間反応させると 28S、18S は分解され、やっかいなことにこの RNase は RNasin では部分的にしか阻害されない。現在は筆者らが精製した程度の質の TAP が和光純薬工業から入手可能である (TAP HG, 和光)。RNA ライゲースもロットによって、質がかなりばらつくので注意が必要である。

3. RT-PCR

無事オリゴキャップがうまくいくと次は RT-PCR である。オリゴ dT か、欲しい mRNA に特異的なプライマーを用いて cDNA を作製し、オリゴキャップに使用したオリゴの塩基配列と、欲しい mRNA のわかっている部分の塩基配列を利用して PCR を行なうのである。RACE 法の場合も同じだが、不幸にして、5' 末端が GC ばかりだったりすると、まず増幅できない。その疑いのあるときは、DMSO を入れたりいろいろ工夫する必要があるが、それについては本号他の項に譲ることにして、ここではオリゴキャップ法に固有の問題を指摘しておきたい。

オリゴキャップ法によって、数～数十%のキャップがオリゴに置換されると考えられる。したがって、普通の RT-PCR より、1 桁から 2 桁多い RNA を使用するか、サイクルを増やす必要がある。一方、PCR の特異性は 5' プライマー (オリゴキャップに使用したオリゴの塩基配列に対応) では出ず、全面的に 3' プライマーに依存している。そこで、3' プライマーは数個合成しておく必要がある。また、5' プライマーも複数個あったほうがよい。

また、5' のプライマーやオリゴキャップに使用するオリゴの塩基配列も問題になることがある。1 つは、特異的なプライマーとの相性の悪い場合である。もう 1 つは非特異的な増幅が起こる場合である。RNA オリゴは当初高価だったこともあって十分な検討を筆者らもしていない。現在筆者らが使用している塩基配列も少し温度の低い条件で PCR を行なうと、非特異的な産物が生じ理想とはいえない状態である。

III. プロトコール

1. BAP 処理

(1) 5~10 μg のポリ(A)+mRNA に対し反応溶液 100 μl [(1 M トリス-HCl (pH 7.8) 10 μl , 1 M DTT 1 μl , RNasin (40 U/ μl) 2.7 μl)] を氷上でセットする。

(2) BAP (TaKaRa, #2110, RNase Free) (0.4 U/ μl) 3 μl を加え, 37°C で 40 分間保温する。

(3) フェノール・クロロホルム抽出を 2 回行なって BAP を完全に除き, 次の TAP 処理で完全な mRNA の 5' 末端からもリン酸基が除かれてしまうのを防ぐ。さらに, エタノール沈殿を行なったのち, 70% エタノールで洗浄し乾燥する。また, アンモニウムイオンは T4 RNA ライゲースの活性を阻害するため, ライゲーション前のエタノール沈殿に, 酢酸アンモニウムは使用しない。

2. TAP 処理

(1) BAP 処理した mRNA に対し反応溶液 100 μl [0.5 M 酢酸ナトリウム (pH 5.5) 10 μl , 50 mM EDTA 10 μl , 100 mM 2-メルカプトエタノール 10 μl , RNasin (40 U/ μl) 2.7 μl] を氷上でセットする。

(2) タバコ培養細胞から精製した TAP (和光, TAP HG を使用可) を使用直前に反応溶液で 20 U/ μl に希釈し, うち 2 μl を加えて 37°C で 30 分間静置する。

(3) フェノール・クロロホルム抽出を 1 回行なったのち, エタノール沈殿を行ない, 70% エタノールで洗浄し乾燥する。

3. RNA ライゲーション

(1) BAP/TAP 処理した mRNA に対し反応溶液 100 μl [0.5 M トリス-HCl (pH 7.8) 10 μl , 50 mM MgCl_2 , 100 mM 2-メルカプトエタノール 10 μl , 5 mM ATP 10 μl , キャッピングに用いる RNA オリゴヌクレオチド 400 ng, RNasin (40 U/ μl) 2.5 μl] を氷上でセットする。

(2) T4 RNA ライゲース (TaKaRa) (50 U/ μl) 5 μl を加えたのち, 50% PEG 8000 50 μl を加えてよく攪拌し, 20°C で 3 時間静置する。

(3) 200 μl の水を加えてからフェノール・クロロホルム抽出を 1 回行なったのち, エタノール沈殿を行なう。ただしこの際, 未反応のオリゴヌクレオチドを除くために高塩濃度 (酢酸アンモニウムを最終濃度 2.5 M) でのエタノール沈殿を 3 回くり返す。

4. 第 1 鎖 cDNA の合成と RNA の除去

(1) 市販の cDNA 合成キットを使用し, オリゴ dT あるいは目的とする mRNA の 5' 末端近傍の既知の塩基配列をプライマーにして第 1 鎖 cDNA 合成を行なう。

(2) 静置終了後, 反応溶液に対し水を加えて 100 μl としフェノール・クロロホルム抽出を行なう。

(3) 0.5 M EDTA 2 μl を加えたのち, 0.1 M NaOH 15 μl を加え 65°C で 1 時間静置することにより鋳型 RNA を完全に加水分解する。

(4) 20 μl の 1 M トリス-HCl (pH 7.8) を加えて反応を停止させ, 未反応のプライマーおよび分解された RNA を除去するために高塩濃度でのエタノール沈殿を 2 回くり返す。

5. PCR

(1) 5' 末端の標識に使用した RNA オリゴヌクレオチドに対応する DNA オリゴヌクレオチドを 5' 側プライマーに, 既知の塩基配列に制限酵素認識部位を付加したものを 3' 側プライマーとして, 第 1 鎖 cDNA の 1/20 程度に対し PCR を行なう。また, その際, 5'/3' 側プライマーおよび cDNA マイナスの対照をおくようにして, 反応条件が適当になるよう検討を行なう。

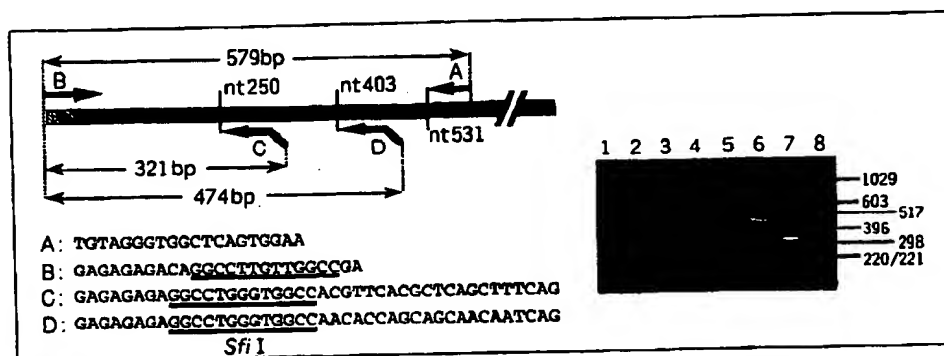


図 4 EF1- α mRNA の 5' 末端の増殖
詳細は本文実験例を参照。

IV. 実験例

オリゴキャップ法を用いて、ヒト培養細胞 (MDA-MB453) より精製したポリ (A)+mRNA の 5' 末端を標識し、次にヒト蛋白質延長因子 1- α (EF1- α) の転写開始部位から 531 塩基下流を 3' 末端とするオリゴヌクレオチド A をプライマーに、第 1 鎖 cDNA の合成を行なった。得られた第 1 鎖 cDNA に対し、オリゴキャッピングに用いたヌクレオチドに対応するプライマー B と EF1- α に特異的な 2 種類のプライマー C, D との組合せで PCR を行なった。結果を図 4 に示す。予想される塩基長の DNA 断片をクローニングし塩基配列を決定したところ、21 クローン中 11 クローンが報告されている転写開始点と一致し、1~6 塩基長いものが 6 クローン、2~3 塩基短いものが 3 クローン確認され、転写開始点が複数あると考えるとそのすべてが完全長 mRNA に由来するクローンであると考えられる (図 5)。

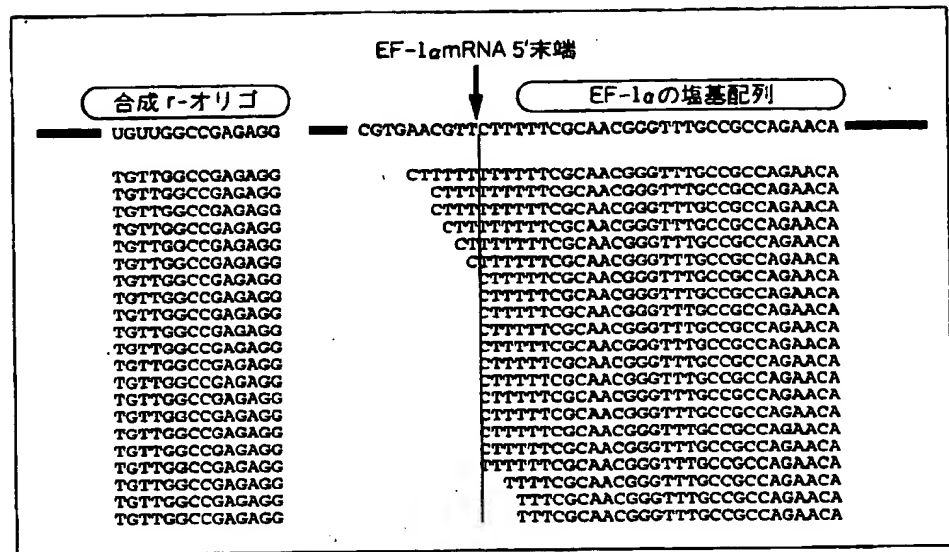
図 5 EF1- α mRNA 5' 末端の構造

図 3 でみられた約 320 bp のバンドをクローン化し、その末端部分の塩基配列を決定した。

おわりに オリゴキャップ法は実験例でもわかるとおり、単に 5' 末端を固定するだけでなく、転写開始部位の細いありさまを見ることを可能にしてくれる。こうした解析から、転写の開始について新しい知見が得られ、新しい機能の解明につながっていくことを期待している。

完全長cDNAライブラリーに向けて キャップ構造のオリゴヌクレオチドによる置換

菅野純夫・丸山和夫

蛋白質のもつ機能を理解するために、その一次構造を決定し、そのcDNAクローンを得ることが重要な一歩となる。cDNAプロジェクトはこの過程の効率化を目指している。したがって、cDNAプロジェクトにとって、完全長cDNAライブラリーの作製はきわめて重要である。完全長cDNAライブラリー作製にあたって、まず、cDNAクローンが完全長か否かを判断できることが必要で、筆者らはその一つの方法として、mRNAのキャップ構造をオリゴヌクレオチドで置換することを考えた。もし、これが可能であれば、この配列をもつcDNAクローンは完

全長であると考えられるし、また、特異な配列をもつオリゴヌクレオチドをmRNAの5'末端に結合させることで、他のさまざまな応用も考えられる。筆者らは、ホスファターゼ、ピロホスファターゼ、RNAリガーゼを用いてオリゴヌクレオチドをmRNAの5'末端に結合させることができた。さらに、このことを踏まえ、完全長cDNAライブラリーの作製のためのベクターの設計と開発を行なった。これらは、完全長cDNAライブラリー作製への一歩と考えられる。

はじめに

分子のレベルで生命を考えると、蛋白質が中心的な機能分子であることは疑いがない。細胞あるいは生体内には、多種類の蛋白質が存在し、蛋白質どうし、または他の分子との相互作用により、細胞や生体内のさまざまな機能を実現している。したがって、蛋白質をコードしているcDNAを分離し、コードする蛋白質の機能を知ることが、生命を分子レベルで理解するために不可欠であるといえよう。また、これらのcDNAを利用し、さまざまな実用的価値をもつものをつくりだしていくことも重要である。

ヒトは約10万種類の遺伝子を持ち、ある特定の細胞では2~3万種類の蛋白質が発現していると推定されて

いる。これまでにクローン化されたのは、その中の1割弱と考えられている。現在のところ、1年あたり1~2千クローンのペースでcDNAのクローン化が進んでいる。この調子で進むと、40~50年でヒトのすべての蛋白質のcDNAをクローン化でき、その一次構造も明らかにされる計算になる。cDNAプロジェクトはこの過程の効率化をめざし、均一化cDNAライブラリー、完全長cDNAライブラリー、subtracted cDNAライブラリーの作製法の開発、cDNAライブラリーの迅速なカタログ化の方法の開発、一次構造の決定に必要な体制の整備などを行なっている。筆者らは、この中で、完全長cDNAライブラリーの作製を目指し、そのための技術開発を行なってきた。まだまだ、途中でであるが、筆者らの工夫を以下に紹介したい。

Sumio Sugano, Kazuo Maruyama, 東京大学医科学研究所(〒108 東京都港区白金台4-6-1) [Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan]

Toward the Construction of a Full Length cDNA Library

Key word [TAP] [RNAリガーゼ] [アダプター]

I 完全長 cDNA とは

最終的に一次構造の決定を目指し、cDNA を網羅的にクローン化しようとする cDNA プロジェクトにおいて、完全長 cDNA ライブラリーの重要さは言を待たない。cDNA ライブラリー中のクローンの多くが完全長の場合、塩基配列の決定や、発現による機能の解析を効率よく進めることができる。このように、完全長 cDNA を作製することは cDNA 合成技術の開発において重要な目標といえる。また、この技術は個々の cDNA クローニングにおいても意味をもち、cDNA プロジェクト以外の分野への波及効果が期待できる。

普通、完全長 cDNA の作製の問題は、長い cDNA を作製する問題として捉えられる傾向がある。個々の cDNA クローニングでは、そのとおりであり、したがって、鋳型となる mRNA の質や逆転写酵素の効率が問題にされる。しかしながら、長い cDNA がすなわち完全長 cDNA ではないことに注意しなければならない。完全長 cDNA の定義は“mRNA のキャップ構造近傍から poly(A) 間の塩基配列に相補的な DNA”というのが妥当であろう。実際、300 塩基長の完全長 cDNA もあれば、10 000 塩基長の不完全長 cDNA もあるのである。このことは、cDNA プロジェクトのように未知の cDNA

クローンを大量に扱う場合、大きな問題となってくる。すなわち、長い cDNA をつくることは別に、完全長と不完全長の cDNA クローンを簡単に区別する必要があるのである。

筆者らは、完全長と不完全長の cDNA を区別する工夫の一つとして、mRNA のキャップ構造をオリゴヌクレオチドで置換することを考えた。もし、置換が可能であれば、そのオリゴヌクレオチドをもつ cDNA クローンはキャップ構造近傍の塩基配列をもつことになり、完全長の cDNA の候補となる。また、cDNA ライブラリーを作製する場合、第二鎖目の合成時にオリゴヌクレオチドに相補的なプライマーを用いることで、リボヌクレアーゼ H を用いることなくアルカリによって RNA を除去しヌクレアーゼ活性のない DNA ポリメラーゼを使用し第二鎖の合成ができる。この場合、ライブラリーには完全長 cDNA クローンが濃縮されていると考えられる。さらに、個々の cDNA の場合は、置換した配列と既知のものを利用して PCR による 5' 末端 cDNA の増幅、クローン化ができるのである。

II キャップ構造のオリゴヌクレオチドでの置換

1 原理

キャップ構造をもつ mRNA をタバコ-アルカリ-ピロホスファターゼ(TAP)で処理すると、キャップと第一番目の塩基(mRNA 転写開始塩基)との間が切断され mRNA の 5' 末端がリン酸基となる(図 1)。そこで、ホスファターゼによって、キャップ構造をもたない RNA の 5' 末端に存在するリン酸基を除いたのち、TAP 処理を行なうと、キャップ構造をもった RNA の 5' 末端のみに、リン酸基を残すことができる。T4 RNA リガーゼは、3' 末端に水酸基をもつオリゴヌクレオチド(アクセプター)に 5' 末端にリン酸基をもつオリゴヌクレオチド(ドナー)を結合する活性をもつ(図 2)。したがって、上記のように、ホスファターゼ処理後 TAP 処理した mRNA に、T4 RNA リガーゼにて適当なオリゴヌクレオチドを結合させると、キャップの結合していた転写開始塩基のみに、適当なオリゴヌクレオチドを結合させることが

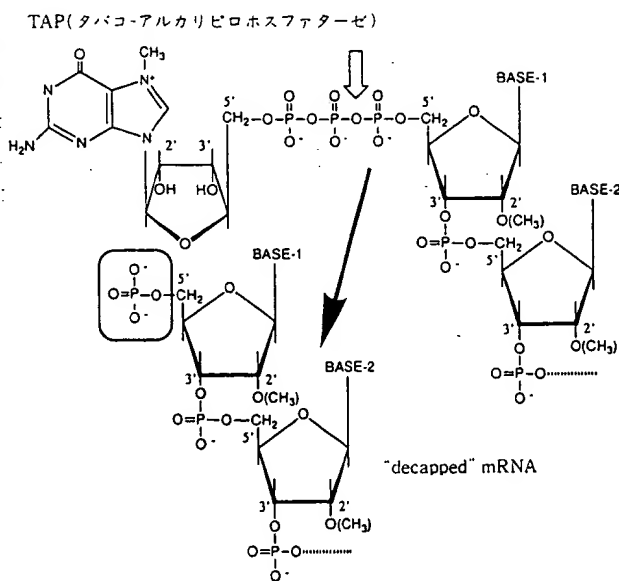


図 1 TAP によるキャップの除去

中の 1 割
り 1~2
進んでい
すべての蛋
白も明ら
この過
り、完
、ライブ
の迅速な
必要な体
中で、完
りための
るが、筆

nce, The

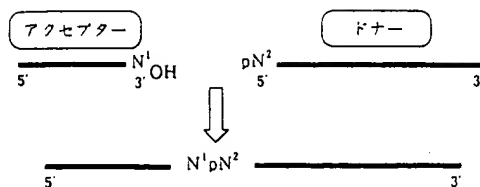
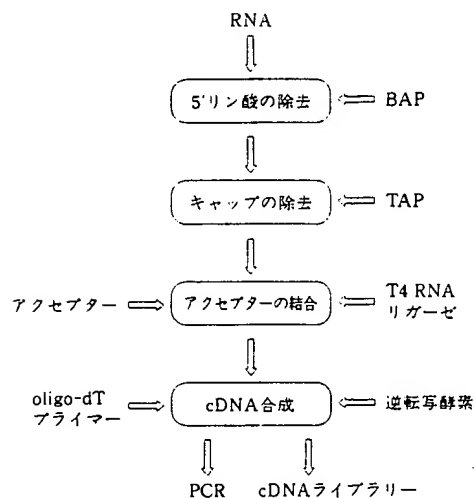


図2 RNAリガーゼによるオリゴヌクレオチドの結合

図3 オリゴヌクレオチドを用いたキャップの置換手順
詳細は本文参照。キャップを置換後のcDNA合成はランダムプライマーを用いてもよい。

できる。アクセプターとしてのオリゴヌクレオチドはさまざまに設計することが可能である(図3)。

2 材料

酵素類：すべて、市販のものが利用可能であるが、TAPは当初供給が不安定だったため、みずから培養タバコ細胞(BY-2)から精製を行なった^{1,2)}。精製したTAPは市販のものに比べて活性が約千倍高く、使用濃度においてRNA分解酵素活性は検出できなかった。数10gのタバコ細胞から今後の実験に十分な量を確保した。

モデルRNA：mRNA(ドナー)のモデルとしては、アデノウイルスE1A遺伝子のpoly(A)シグナルを含む末端に30個のアデニン加えた約250塩基の*in vitro*転写産物とキャップをもつ市販のウサギβ-グロビンmRNA(約600塩基)を使用した。アクセプターは、SP6ポリメラーゼで*in vitro*合成したRNAや合成オリゴボ

ヌクレオチドを使用した。

3 反応条件など

ホスファターゼ、TAPは標準的な条件で反応を行なう。T4 RNAリガーゼの結合活性は比較的低いことが知られていた。しかし最近、PEGなどを反応液に加えることで短い分子ではかなり効率よく結合反応が起こることが報告された(例えば文献3)。反応液組成・反応温度・反応時間などを検討した結果、PEG存在下でモデルRNA(250塩基)を3~5割の効率で結合させることが可能であった。長いRNA分子間で高率な結合がみられることは、アクセプターにさまざまな活性部位を導入できることを示している。

4 β-グロビン mRNA 5' 末端の増幅

図3に従い、β-グロビン mRNAをバクテリアアルカリホスファターゼとTAPで処理し、その後、合成オリゴヌクレオチドとT4 RNAリガーゼで結合させた。oligo-dTをプライマーにcDNAを合成したのち、cDNAを鋳型に、図4に示すプライマーを用いてPCRを行なった。この結果、図4にみられるように、合成オリゴヌクレオチドが5'末端に結合した場合に期待される長さのPCR産物が得られた。すなわち、キャップ構造をオリゴヌクレオチドで置換しえたものと考えられる。

5 アクセプター・ドナーの区別

合成オリゴヌクレオチドは3'末端にOH基をもち、5'末端にリン酸基をもたないためアクセプターになるがドナーにはならない。一方、mRNAの方は、TAP処理により1個のリン酸基が5'末端に残るためドナーになる。それと同時に、3'末端にOH基があるためアクセプターにもなりうる。アクセプターとドナー分子を完全に区別するためには、ドナー分子の3'末端のOH基の部分ブロックする必要がある。はじめ、poly(A)ポリメラーゼでmRNAの3'末端にコルディセピン5'三リン酸(ATPの3'OHをHに換えた構造をもつ)の導入を考えた。しかし、poly(A)ポリメラーゼの非常に高い基質特異性のためコルディセピンは導入できなかった。次に、T4 RNAリガーゼの最小基質であるpCp(図5)の導入を検討した。pCpは現在アイソトープでしか入手できず至適濃度での検討はできなかったが、効率よく3'末端がブロックできることがわかった。pCpを

反応を行な
まいことが
液に加え
反応が起こ
組成・反応
存在下でモ
させること
場合がみら
部位を導

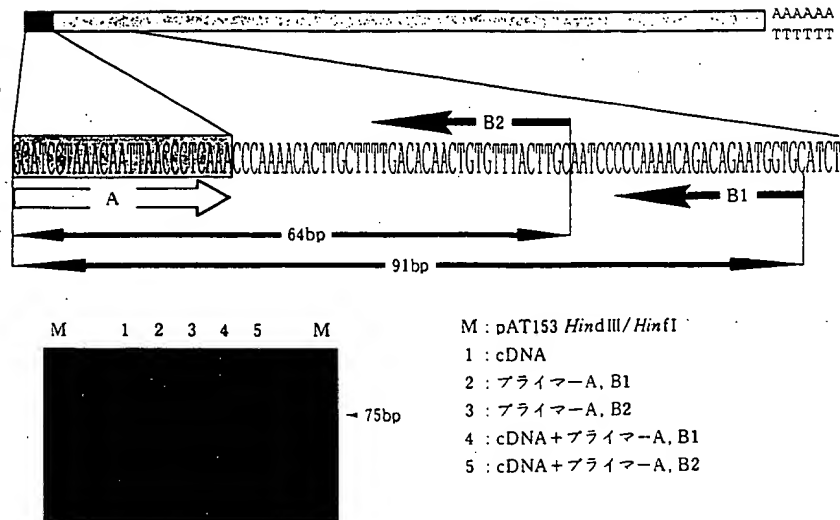


図4 キャップを置換した mRNA を用いての 5' 末端の同定

β -グロビン mRNA のキャップを図3に示した方法で A のオリゴヌクレオチドで置換し、その後 cDNA として、それを A と B1 または A と B2 をプライマーにして PCR を行なった。それぞれ、A が mRNA の 5' 末端に結合した場合に期待される長さの PCR 産物ができていることがわかる。A と B1 を使用した場合には、A と B1 が直接結合したと考えられる位置に、cDNA の有無にかかわらず PCR 産物がみえる。

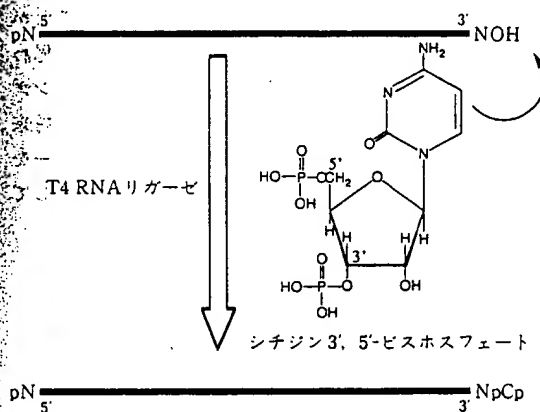


図5 pCp を用いた mRNA 3' 末端のブロック

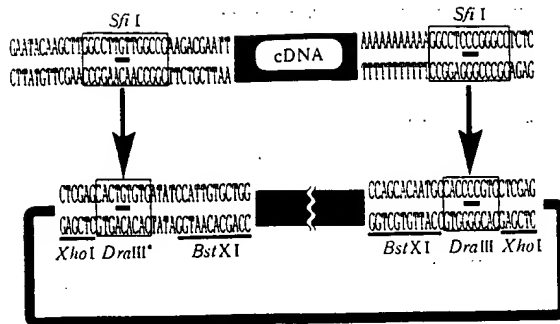
用いたブロックはホスファターゼ処理後 TAP 処理前に行なう必要がある。

III ベクターの改良

1 ベクター・アクセプター・プライマーの設計

完全長 cDNA を特異的にクローニングするためのベクター・アクセプター・プライマーの作製を行なった。

満たすべき条件は、(1) アクセプター配列をもつ(つまり、5' 末端まで伸びた) cDNA のみをクローン化する、(2) mRNA の 5' 末端 3' 末端の方向を決めてクローン化できる、(3) cDNA のないクローンは生じない、である。(1)については、出現頻度の低い制限酵素切断部位をアクセプターに導入し、その切断部位が存在することをアクセプター配列をもつことと目安とした。このために選んだ制限酵素は *Sfi*I である。*Sfi*I は 8 塩基認識の制限酵素で、3 塩基長の 3' 突出端の切り口をもつ。この切り口にあたる 3 塩基は切断部位の認識配列に含まれないので、自由に配列を選べる。*Dra*III は 6 塩基認識の制限酵素であるが、*Sfi*I と同様の切り口をもつ。5' と 3' のクローニング部位を互いに相補的でない塩基配列をもつ *Dra*III 部位とし、5' 側の *Dra*III 部位はアクセプターの *Sfi*I 部位に対応し、3' 側の *Dra*III 部位は cDNA 合成の oligo-dT プライマーの *Sfi*I 部位に対応するように設計すると、(2)と(3)の条件を満たす(図6)。すなわち、ベクターを *Dra*III で切断し、不必要な断片を除去するとベクター自体の再環状化が起こらない。また、図7のような oligo-dT プライマー + *Sfi*I をプライマーにしてキャップをアダプターで置換した mRNA の cDNA を定法ど

図 6 *Sfi*I を利用したクローニングシステム

詳細は本文参照。この例では、キャップを置換するオリゴヌクレオチドの *Sfi*I 部位の断端は TGT、cDNA 合成のオリゴ dT アダプター上の *Sfi*I 部位の断端は GGG となるようにしてあり、cDNA どうしもベクターどうしも結合できない。

おり合成したのち、*Sfi*I による切断をすれば、生じた cDNA 断片を方向を決めてベクターの *Dra* III 部位に挿入できる。

この方法のよいところは、ベクターどうしだけでなく cDNA どうしも互いに結合できない点にある。現在使用されている cDNA ライブラリーには、cDNA どうしがライブラリーの作製過程で結合した結果、2 種以上の cDNA をもつようになったクローンが一定の割合で存在するため、cDNA プロジェクトでの問題の一つになっている。この方法の欠点は *Sfi*I で cDNA を切断する必要がある点で、このため、8 塩基認識で頻度は低いとはいえ、*Sfi*I 認識部位をもつ cDNA はクローン化されない。

2 ベクターの作製

動物細胞での効率のよい発現を目指す pME 18 SCG, cDNA の一次構造決定に有用なベクター pMFL を作製した。ともに、上記の *Dra* III クローニング部位をもち、pME 18 SCG は強力なプロモーターの *SRα* を、pMFL は *Exo* III を利用した欠失の作製に有用な部位と一本鎖 DNA 作製のために必要な *f1 ori* をもっている(図 7)。

おわりに

完全長 cDNA ライブラリーの作製をめざして筆者らが開発した、mRNA のキャップ構造をオリゴヌクレオチドにより置換する方法について紹介してきた。 β -グロビン mRNA を用いた予備検討の結果、アクセプター分子をキャップのかわりに結合させることが可能であった。長いアクセプター分子も効率よく結合できることから、さまざまな活性をもつ塩基配列を結合することが可能で設計の自由度は非常に高い。さらに、各種酵素と基質の使い分けによってアクセプターとドナー分子を完全に区別できることから、少量の試料からライブラリーの作製が可能と思われる。また、効率のよい完全長 cDNA のクローニング系をめざして、いくつかのベクターを作製した。将来的には、数種の組織から完全長 cDNA ライブラリーを作製し、必要に応じて希望者に供給できるようにしていきたいと思う。

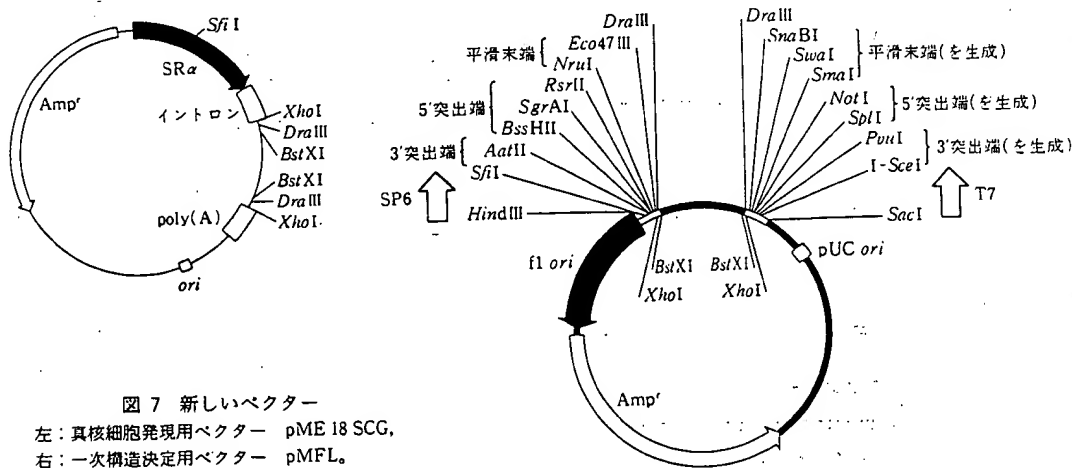


図 7 新しいベクター

左：真核細胞発現用ベクター pME 18 SCG,
右：一次構造決定用ベクター pMFL。

完全長 cDNA ライブラリー, 完全長 cDNA ライブラリー, subtracted cDNA ライブラリーの作製法の開発, cDNA ライブラリーのカatalog化など, cDNA プロジェクトの初期に目指した目標は徐々に達成されつつある。以後, これらのライブラリーから分離された cDNA の塩基配列の決定や機能の解析が前面へとでてきた。したがって, その方向での技術開発が重要である。現在, 塩基配列の決定の効率は 1 クローンあたり 300 塩基前後である。もしこれが 1000 塩基前後となれば, cDNA の塩基配列決定の効率は飛躍的に向上し, 2000 塩基前後となれば, 多くの mRNA から考えて, それ以上の向上は必要ないレベルになる。この程度の向上は, 既存の技術の延長上に達するのではないと思われる。10 年後, われわれはほとんどの遺伝子の cDNA 塩基配列が決定されて

いる世界で研究しているかもしれない。

mRNA のキャップのオリゴヌクレオチドによる置換について貴重なご教示をいただいた, 北里大学の水本清久教授, BY-2 細胞を分与していただいた日本たばこ株式会社生命科学研究所の増田 税主任研究員に感謝いたします。

文 献

- 1) Shinshi, H., Miwa, M., Kato, K., Noguchi, M., Matsushima, T., Sugimura, T.: *Biochemistry*, 15, 2185-2190 (1976)
- 2) Efstratiadis, A., Vournakis, J.N., Donis-Keller, H., Chaconas, G., Dougall, D.K., Kafatos, F.C.: *Nucl. Acids Res.*, 4, 4165-4174 (1977)
- 3) Tessier, D.C., Brousseau, R., Vernet, T.: *Anal. Biochem.*, 158, 171-173 (1986)

の作製をめざし, キャップ構造を調べる方法について, 用いた予備検出プロのかわりに結合アクセプター分子, さまざまな活性を, 設計の自由度は非, 使い分けによ, こ区別できるこ, り作製が可能と思, NA のクロー, ーを作製した。NA ライブラリー, 給できるようにし

平滑末端(を生成)

5'突出端(を生成)

PvuI 3'突出端(を生成)

1-SacI

↑ T7

— SacI

ori

RT-PCR法

② オリゴキャップ法によるmRNA 5'末端のクローニング

鈴木 穰・菅野純夫

mRNAの5'末端を分離する方法としてオリゴキャップ法を紹介する。オリゴキャップ法はmRNAのキャップをTAPではずし、そこに合成オリゴヌクレオチドをRNAライゲースで結合させて、5'をマークし、合成オリゴヌクレオチドに対応する配列と分離したいmRNAの配列を利用したPCRで5'末端を増幅する方法である。この方法はRNAを直接取り扱うので手技的にむずかしいものの、原理的には本当のmRNAの5'末端を分離できる方法である。

Key words 【オリゴキャップ法】

はじめに mRNAの5'末端をクローニングする方法には、RACE法など、いくつかの方法がある。このなかで、筆者らの開発したオリゴキャップ法は、いままでにない原理を応用した方法である。RACE法など従来の方法は、基本的に、存在するcDNAのなかで1番長いものを分離しようとする方法といえる。逆転写酵素はmRNAの5'末端を超えてcDNAを伸ばすことはできないと考えられるので（実際にはヘアピン構造をつくって長く伸びてしまう場合もあるが）、一番長いcDNA=5'末端まで伸びたcDNAと考えるわけである。この原理は基本的にたいへん結構なのだが、実際においては、cDNAをつくりつくし、調べつくすことが不可能なので、得られたクローンが本当に5'末端まで伸びたものなのか、常に一抹の不安を残すことになる。とくにスタートコドンと思われるものの前にインフレームのストップコドンがない場合など、強い不安にかられることが多い。

これに対し、オリゴキャップ法はmRNAの5'末端に存在するキャップ構造を標的にした方法で、合成オリゴヌクレオチドでキャップ構造を置換することがその基本になっている。cDNAが5'末端のものかどうかの判断は、cDNAの長さではなく、オリゴキャップに用いたオリゴの塩基配列が、cDNAの末端に存在するかどうかによって行なう。そしてこの場合、オリゴの結合している塩基がmRNAの転写開始のまさにその塩基ということになる。この方法でmRNAの5'末端をもつクローンを分離すると、従来のものよりたいへん長いものがとれてくるが、ときには短い場合もある。この場合、複数の転写開始部位があると考えたほうがよい場合が多い。

オリゴキャップ法はRNAを操作するために手技的にむずかしく、また、必要な酵素も、よい質のものが手に入りにくいこともあって、広く行なわれる方法になっていない。しかし、上記のように、従来の方法とは

Yutaka Suzuki, 東京大学大学院総合文化研究科 (〒113 東京都文京区本郷7-3-1) [International and Interdisciplinary Studies, University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan]

Sumio Sugano, 東京大学医科学研究所 (〒108 東京都港区白金台4-6-1) [Institute of Medical Science, University of Tokyo, Siroganedai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan]

Isolation of mRNA 5'-end Using Oligo-Capping

異なるものであり、それなりのメリットのあるものなので、キット化などの努力をして、多くの方に使っていただけるシステムにしていきたいと考えている。

I. オリゴキャップ法の原理

図1にオリゴキャップ法の概要を、また図2にはそれによる mRNA 5' 末端クローニングの全体像を示した。オリゴキャップ法はもともと、

mRNA のスタートの塩基を決定する際に用いられたポストラベル法を基礎にしている。すなわち、酸性ピロフォスファターゼ (TAP) でキャップをはずす (図3参照)。その後、露出した 5' 末端のリン酸基を標的に、合成オリゴヌクレオチドを RNA ライゲースで 5' 末端に結合させるわけである。ただ、細胞から分離してきた mRNA [ポリ(A)+RNA] には、途中で切れた RNA やミトコンドリアの由来の mRNA など、キャップをもたないものも多数ある。したがって、結合をキャップ特異的に行なわせるために、キャップをもたないものの 5' 末端に存在するリン酸基をフォスファターゼ (BAP) であらかじめはずしておく。

RNA ライゲースは 1 本鎖の RNA または DNA を結合させることができる。ただ、RNA-RNA の場合に比べ、DNA-RNA の場合の効率は 1/10、DNA-DNA の場合は 1/100 といわれている。実際、オリゴキャップのオリゴとして DNA を使用してみたが、うまくいかないことが多かった。いまは、RNA と DNA のキメラ分子を作製することができる。DNA オリゴの 3' 末端に 1~3 塩基の RNA を結合させることで RNA オリゴと同等の効率で RNA と結合させることができる (加藤ら：私信)。

II. オリゴキャップ法を行なうにあたって考えること

1. RNA

RACE 法などは cDNA になったものを操作する。これに対し、オリゴキャップ法は RNA を扱う必要がある。

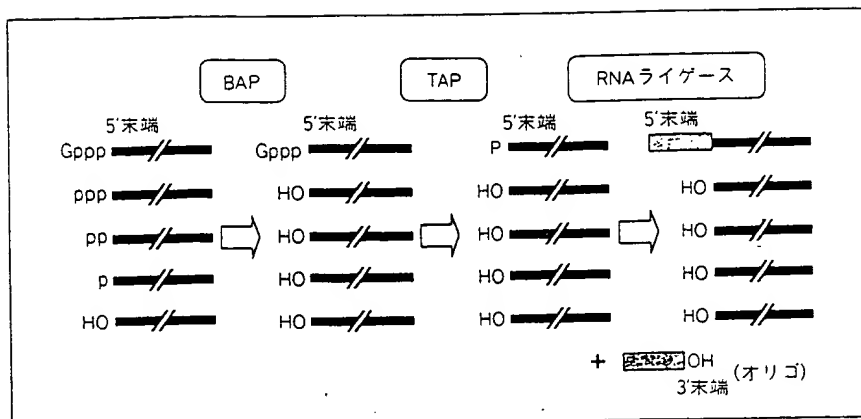


図1 オリゴキャップ法の概要

■: RNA, BAP: 細菌アルカリフォスファターゼ, TAP: タバコ酸性ピロフォスファターゼ.

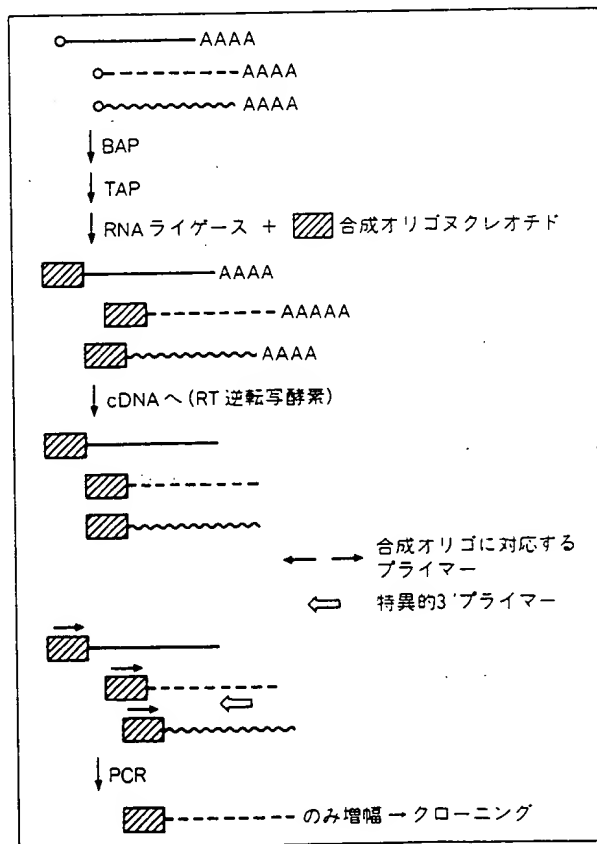


図2 オリゴキャップ法による 5' 末端クローニングの全体の流れ

したがって、RNA を扱った経験があったほうがよい。とくに、cDNA ライブラリーを作製した経験があることが望ましい。また、RNA を扱う体制が研究室にある必要がある。隣の人が大量に RNase を使用しているよ

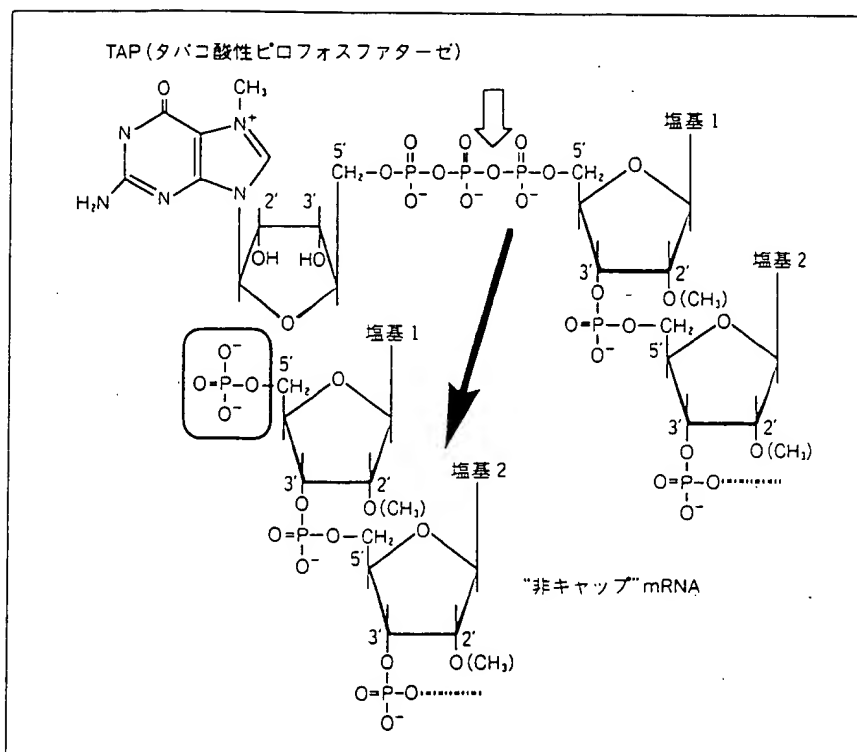


図 3 mRNA キャップ構造の TAP による切断

うな状態ではやらないほうが無難である。

また、RNA をかなりの段階を踏んで酵素処理していくので RNA が量的に確保されているほうがよい。培養細胞由来の RNA で目的があればよいが、特殊な組織や細胞のものとなると量の確保が格段に困難になる。

2. 酵 素

酵素はもちろん、RNase のない酵素を使用する必要がある。具体的なプロトコールのところに、筆者らが使用している酵素をあげておいた。他のものは試していないものもあるので、個別にチェックする必要がある。とくに、TAP はよいものがなかったので、自分たちで精製した。筆者らが精製したものは、普通使用する濃度の 10 倍量、全 RNA と 37°C、2 時間反応させても 28S、18S リボソーム RNA はほとんど変化しないものである。もっとも、20 時間反応させると 28S、18S は分解され、やっかいなことにこの RNase は RNasin では部分的にしか阻害されない。現在は筆者らが精製した程度の質の TAP が和光純薬工業から入手可能である (TAP HG, 和光)。RNA ライゲースもロットによって、質がかなりばらつくので注意が必要である。

3. RT-PCR

無事オリゴキャップがうまくいくと次は RT-PCR である。オリゴ dT か、欲しい mRNA に特異的なプライマーを用いて cDNA を作製し、オリゴキャップに使用したオリゴの塩基配列と、欲しい mRNA のわかっている部分の塩基配列を利用して PCR を行なうのである。RACE 法の場合も同じだが、不幸にして、5' 末端が GC ばかりだったりすると、まず増幅できない。その疑いのあるときは、DMSO を入れたりいろいろ工夫する必要があるが、それについては本号他の項に譲ることにして、ここではオリゴキャップ法に固有の問題を指摘しておきたい。

オリゴキャップ法によって、数～数十%のキャップがオリゴに置換されると考えられる。したがって、普通の RT-PCR より、1 桁から 2 桁多い RNA を使用するか、サイクルを増やす必要がある。一方、PCR の特異性は 5' プライマー (オリゴキャップに使用したオリゴの塩基配列に対応) では出ず、全面的に 3' プライマーに依存している。そこで、3' プライマーは数個合成しておく必要がある。また、5' プライマーも複数個あったほうがよい。

また、5' のプライマーやオリゴキャップに使用するオリゴの塩基配列も問題になることがある。1 つは、特異的なプライマーとの相性の悪い場合である。もう 1 つは非特異的な増幅が起こる場合である。RNA オリゴは当初高価だったこともあって十分な検討を筆者らもしていない。現在筆者らが使用している塩基配列も少し温度の低い条件で PCR を行なうと、非特異的な産物が生じ理想とはいえない状態である。

III. プロトコール

1. BAP 処理

(1) 5~10 μg のポリ(A)+mRNA に対し反応溶液 100 μl [(1 M トリス-HCl (pH 7.8) 10 μl , 1 M DTT 1 μl , RNasin (40 U/ μl) 2.7 μl)] を氷上でセットする。

(2) BAP (TaKaRa, #2110, RNase Free) (0.4 U/ μl) 3 μl を加え, 37°C で 40 分間保温する。

(3) フェノール・クロロホルム抽出を 2 回行なって BAP を完全に除き, 次の TAP 処理で完全な mRNA の 5' 末端からもリン酸基が除かれてしまうのを防ぐ。さらに, エタノール沈殿を行なったのち, 70% エタノールで洗浄し乾燥する。また, アンモニウムイオンは T4 RNA ライゲースの活性を阻害するため, ライゲーション前のエタノール沈殿に, 酢酸アンモニウムは使用しない。

2. TAP 処理

(1) BAP 処理した mRNA に対し反応溶液 100 μl [0.5 M 酢酸ナトリウム (pH 5.5) 10 μl , 50 mM EDTA 10 μl , 100 mM 2-メルカプトエタノール 10 μl , RNasin (40 U/ μl) 2.7 μl] を氷上でセットする。

(2) タバコ培養細胞から精製した TAP (和光, TAP HG を使用可) を使用直前に反応溶液で 20 U/ μl に希釈し, うち 2 μl を加えて 37°C で 30 分間静置する。

(3) フェノール・クロロホルム抽出を 1 回行なったのち, エタノール沈殿を行ない, 70% エタノールで洗浄し乾燥する。

3. RNA ライゲーション

(1) BAP/TAP 処理した mRNA に対し反応溶液 100 μl [0.5 M トリス-HCl (pH 7.8) 10 μl , 50 mM MgCl_2 , 100 mM 2-メルカプトエタノール 10 μl , 5 mM ATP 10 μl , キャッピングに用いる RNA オリゴヌクレオチド 400 ng, RNasin (40 U/ μl) 2.5 μl] を氷上でセットする。

(2) T4 RNA ライゲース (TaKaRa) (50 U/ μl) 5 μl を加えたのち, 50% PEG 8000 50 μl を加えてよく攪拌し, 20°C で 3 時間静置する。

(3) 200 μl の水を加えてからフェノール・クロロホルム抽出を 1 回行なったのち, エタノール沈殿を行なう。ただしこの際, 未反応のオリゴヌクレオチドを除くために高塩濃度 (酢酸アンモニウムを最終濃度 2.5 M) でのエタノール沈殿を 3 回くり返す。

4. 第 1 鎖 cDNA の合成と RNA の除去

(1) 市販の cDNA 合成キットを使用し, オリゴ dT あるいは目的とする mRNA の 5' 末端近傍の既知の塩基配列をプライマーにして第 1 鎖 cDNA 合成を行なう。

(2) 静置終了後, 反応溶液に対し水を加えて 100 μl としフェノール・クロロホルム抽出を行なう。

(3) 0.5 M EDTA 2 μl を加えたのち, 0.1 M NaOH 15 μl を加え 65°C で 1 時間静置することにより鋳型 RNA を完全に加水分解する。

(4) 20 μl の 1 M トリス-HCl (pH 7.8) を加えて反応を停止させ, 未反応のプライマーおよび分解された RNA を除去するために高塩濃度でのエタノール沈殿を 2 回くり返す。

5. PCR

(1) 5' 末端の標識に使用した RNA オリゴヌクレオチドに対応する DNA オリゴヌクレオチドを 5' 側プライマーに, 既知の塩基配列に制限酵素認識部位を付加したものを 3' 側プライマーとして, 第 1 鎖 cDNA の 1/20 程度に対し PCR を行なう。また, その際, 5'/3' 側プライマーおよび cDNA マイナスの対照をおくようにして, 反応条件が適当になるよう検討を行なう。

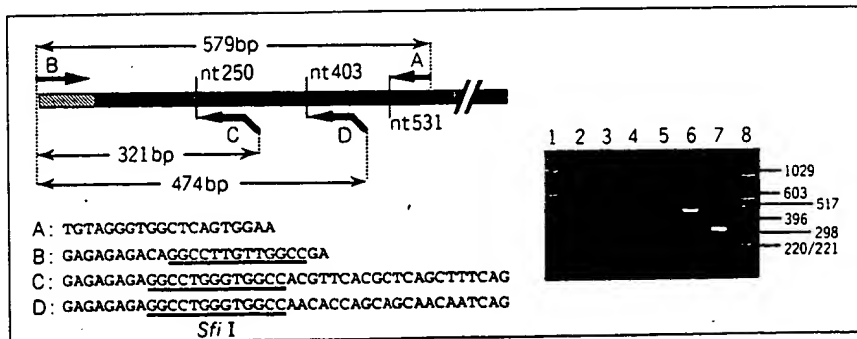


図 4 EFl- α mRNA の 5' 末端の増殖
詳細は本文実験例を参照。